

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年10月21日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/089386 A1(51) 国際特許分類:
39/395, A61P 3/04, A23L 1/32, 1/30

A61K 35/54,

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5ビル 3階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005006

(22) 国際出願日: 2004年3月7日 (07.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-106670 2003年4月10日 (10.04.2003) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ゲン・コーポレーション (GHEN CORPORATION)
[JP/JP]; 〒5011132 岐阜県岐阜市折立296番地1
Gifu (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 見玉 義勝 (KODAMA, Yoshikatsu) [JP/JP]; 〒5011101 岐阜県岐阜市
佐野839番地1 株式会社ゲン・コーポレーション
免疫研究所内 Gifu (JP). 五島 英雄 (GOSHIMA, Hideo)
[JP/JP]; 〒5011101 岐阜県岐阜市佐野839番地1 株
式会社ゲン・コーポレーション 免疫研究所内 Gifu
(JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

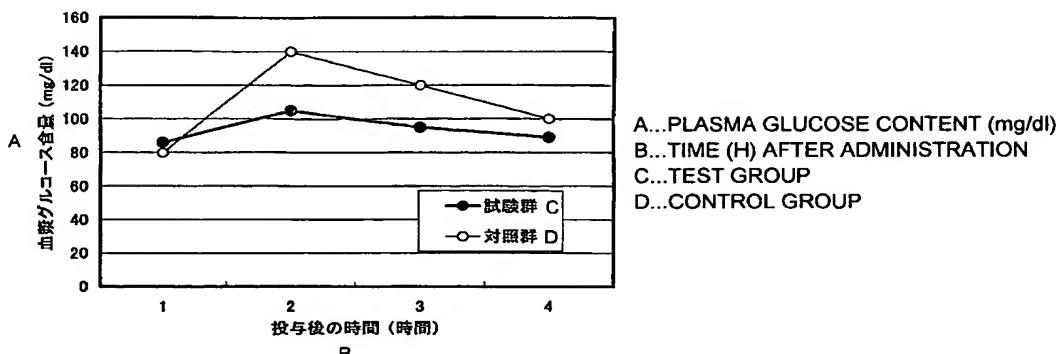
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTOBESTIC AGENT USING HEN' S EGG ANTIBODY AGAINST DIGESTIVE ENZYMES

(54) 発明の名称: 消化酵素に対する鶏卵抗体を用いた抗肥満剤



(57) Abstract: It is intended to provide a highly safe digestive enzyme inhibitor and an antobestic agent having an activity of inhibiting digestive enzymes at a high specific-specificity. Namely, a composition containing an egg laid by a hen having been immunized with digestive enzymes or fragments thereof, wherein the digestive enzymes comprise at least two digestive enzymes.

(57) 要約: 本発明の課題は、基質特異性の高い消化酵素阻害活性を有し、かつ安全性が高い消化酵素阻害剤及び抗肥満剤を提供することである。本発明は、消化酵素又はその断片で免疫した鶏が産生した卵又はその処理物を含む組成物であって、該消化酵素が2種以上の消化酵素を含む該組成物に関する。

明 細 書

消化酵素に対する鶏卵抗体を用いた抗肥満剤

5 技術分野

本発明は、肥満を予防及び改善する効果を有する抗体、該抗体を含む食品及び抗肥満剤に関する。

背景技術

10 近年、食生活の欧米化に伴って、栄養過多等の原因により肥満が増加している。また、ペットにおいても、同様に肥満が増加している。肥満は動脈硬化症の危険因子の一つでもあり、また、糖尿病や高脂血症とも関連があり、深刻な問題になっている。

肥満は身体に脂肪が過剰に蓄積した状態であるが、脂肪が体内に蓄積する原因15 は糖質の過剰摂取又は脂肪の過剰摂取である。糖質を過剰に摂取することにより肥満に至るメカニズムは飲食物中に含まれる糖質が消化され单糖となり、小腸より体内に吸収され血糖値が上昇し、その刺激でインスリンが脂肪細胞に働き血液中の单糖を脂肪細胞に取り込ませ、脂肪に変える。一方、食品成分の内、最も高20 カロリーである脂肪（トリグリセリド）が臍リパーゼにより加水分解されると、ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロールを経て、グリセロールと脂肪酸が生じ、小腸から吸収されるが、摂取カロリーの過剰は臍臓カロリーを増大するように働く。すなわち、過剰な脂肪摂取により、肥満あるいは高脂血症、動脈硬化症となる。

そこで、肥満に至るこれらいづれかの経路の一部を阻害することにより、抗肥25 满作用が得られるものと期待される。すなわち、糖質過剰摂取から肥満に至る経路を阻害する糖質分解酵素阻害作用、单糖吸収抑制作用又は血糖上昇抑制作用により肥満を予防又は改善できると考えられる。同様に、脂肪過剰摂取から肥満に至る経路を阻害する脂質分解酵素阻害作用により、コレステロール低下、血中トリグリセリド低下をもたらし、肥満防止が可能と考えられる。

30 まず、糖質分解酵素阻害作用、单糖吸収抑制作用又は血糖上昇抑制作用がある

が、これらは糖質を摂取することにより肥満に至る経路を阻害する作用である。

糖質分解酵素阻害剤は、多糖類から单糖類への分解を担う糖質分解酵素を阻害し、経口摂取による糖質の消化を遅延させることで食後の急激な血糖上昇を抑制する。糖質分解酵素の機能が阻害されることにより、多糖類から单糖への分解が5 徐々に起こるため、小腸からの单糖の吸収が遅延し、血糖の上昇が抑制される。その結果、糖質からの脂質合成が抑制され、体脂肪の蓄積が減少すると考えられる。

また、糖質の過剰摂取による食後の急激な血糖上昇と過剰なインスリン分泌は、肥満以外に糖尿病及び高脂血症をも助長すると考えられていることから（薬理と10 治療 19巻、No. 10、284 (1991) 参照）、糖質分解酵素を阻害することにより、糖尿病又は高脂血症も予防、改善できると考えられる。そして、高脂血症を予防することは、動脈硬化の予防に効果的である。以上から、糖質分解酵素阻害剤、单糖吸収阻害剤又は血糖上昇抑制剤は、抗糖尿病剤、抗高脂血症剤として、さらには抗動脈硬化剤として有用と考えられる。

15 現在、医薬品として使用されている糖質分解酵素阻害剤としては、 α -グルコシダーゼ阻害剤があり、動物実験ならびに臨床試験において、食後の血糖値の上昇抑制効果が確認されており、抗肥満効果及び抗糖尿病効果も報告されている（Res. Exp. Med. 175: 87 (1979)、日本農芸化学会誌 63巻、217 (1989)、New Current 6: 2 (1995) 参照）。

20 次に、リパーゼ阻害作用であるが、これらは脂肪（トリグリセリド）摂取から肥満に至る経路を阻害する作用である。脂肪は脾リパーゼにより分解されて小腸から吸収されるので、リパーゼの酵素活性を阻害することにより血中のトリグリセリドを低下させ、抗肥満効果が得られると考えられる。また、腸管からの脂肪吸収を抑えることにより血清脂質が低下するため、抗高脂血症剤として有用であると考えられる。

25 抗肥満作用を有する数多くの化学合成化合物及び天然化合物がこれまでに知られている。化学合成化合物は投与に際して安全性の問題で不安を感じる場合もあった。一方では、食品に抗肥満剤を配合し、日常生活の中で肥満予防を希望するニーズがあつても、化学合成化合物であることや、投与量の多さから、服用時に30 不快感を示す例も多い。このような社会のニーズに対して、主として、天然物由

来の抗肥満剤が数多く開発されてきた。

例えば、ハイドロキシシトリックアシッド、ノジリマイシン、プロシアニジン、フラボノイド及びそれらの配糖体、カテキン類、ヒノキチオール、ベンゾフェノン誘導体、トリテルペン類化合物及びその誘導体、スクレロチオリン、カウレロペニン、コレウスフォルスコリ等、非常に多くの抗肥満作用を有する成分が特定されてきた。これらの成分は植物、海草等の抽出物から精製又は抽出物のままで使用される。これらの天然物由来成分の消化酵素に対する阻害作用は基質特異性が低いため、抗肥満作用は満足できるものではなく、また、用量によっては消化不良等の副作用の原因になることも懸念されている。

10 本発明者らは、う蝕の原因菌である*Streptococcus mutans*の菌体外膜に存在しているグルコシルトランスフェラーゼが唾液不溶性のグルカンを合成することを発見し、そして、その酵素を産卵鶏に免疫することによって得られた鶏卵抗体は、当該酵素活性を効率よく不活性化することにより、本グルカン合成を抑制し、抗う蝕効果を発揮することを発見した（特許第2641228号参照）。

15 しかしながら、上記のような消化酵素に対する抗体を用いて該酵素を阻害した例はこれまでなく、また、鶏を用いた抗体の調製においては、抗原の種類によっては必ずしも十分な抗体価が得られるとは限らない。従って、糖質分解酵素又は脂質分解酵素等の消化酵素に対する鶏卵抗体がこれらの酵素活性を小腸内で阻害することによって十分な抗肥満作用を有するか否かは不明であった。

20

発明の開示

本発明の課題は、基質特異性の高い消化酵素阻害活性を有し、かつ安全性が高い消化酵素阻害剤及び抗肥満剤を提供することである。

本発明者らは、前記課題を達成すべく銳意研究を重ねた結果、糖質分解酵素及び脂質分解酵素等の消化酵素で免疫した鶏が産生する卵から調製される鶏卵抗体によって上記課題が解決できることを見出し本発明を完成させるに至った。

そして本発明者らは、上記抗体がin vitroでこれらの消化酵素の活性を有意に抑制することを確認した。また、動物実験として糖質（デンプン）又は脂質（コーンオイル）負荷ラットを用いることにより、各々、血糖上昇抑制作用、グルコース吸収抑制作用及び血中トリグリセリド低下作用、コレステロール低下作用を

確認し、さらに驚くべきことは、2種以上の抗体を含む組成物を混合して投与すると相乗的な抗肥満効果が得られることを確認した。

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 消化酵素又はその断片で免疫した鶏が産生した卵又はその処理物を含む組成物であって、該消化酵素が2種以上の消化酵素を含む該組成物。

(2) 2種以上の消化酵素又はその断片で免疫した同一の鶏が産生した卵又はその処理物を含む(1)に記載の組成物。

(3) 少なくとも1種の消化酵素又はその断片で免疫した鶏が産生した卵又はその処理物と、該消化酵素とは異なる消化酵素又はその断片で免疫した鶏が産生した卵又はその処理物とを混合してなる(1)に記載の組成物。

(4) 消化酵素が、糖質分解酵素、脂質分解酵素及びタンパク質分解酵素からなる群から選択される(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 卵の処理物が抗体である(1)～(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) (1)～(5)のいずれかに記載の組成物を含む消化酵素阻害剤。

(7) (1)～(5)のいずれかに記載の組成物を含む抗肥満剤。

(8) (1)～(5)のいずれかに記載の組成物を含む食品。

本発明において、消化酵素とは、消化に携わる酵素を意味する。本発明において免疫原として使用できる消化酵素は特に制限されず、糖質分解酵素、脂質分解酵素、タンパク質分解酵素及び核酸分解酵素が含まれる。糖質分解酵素、脂質分解酵素及びタンパク質分解酵素を使用するのが好ましい。

本発明において糖質分解酵素とは、二糖類を含むオリゴ糖又は多糖類を基質として分解する活性を有する酵素を意味する。本発明において使用する糖質分解酵素は特に制限されず、多糖を基質とするポリアーゼ及びオリゴ糖を基質とするオリガーゼを含む。ポリアーゼには、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、セルラーゼ、イヌリナーゼなどが含まれ、オリガーゼには、 α -グリコシダーゼ及び β -グリコシダーゼ、例えば、スクラーゼ、マルターゼ、イソマルターゼ、ラクターゼ、トレハラーゼ等が含まれる。本発明においては、アミラーゼ、特に脾臓 α -アミラーゼを使用するのが好ましい。

本発明において脂質分解酵素とは、中性脂質又はリン脂質を基質として分解する活性を有する酵素を意味する。本発明において使用できる脂質分解酵素は特に

制限されず、中性脂肪を基質とするリパーゼ及びリン脂質を基質とするホスホリパーゼ等が含まれる。本発明では脾リパーゼを使用するのが好ましい。

本発明においてタンパク質分解酵素とは、タンパク質を基質としてこれに作用し、そのペプチド結合 (-CO-NH-) の分解を促進する加水分解酵素を意味する。本
5 発明において使用できるタンパク質分解酵素は特に限定されず、タンパク質内部のペプチド鎖に作用するもの(すなわちペプチジルペプチドヒドロラーゼ)、ペプチド鎖のアミノ基をもつ末端に作用するもの(アミノアシルペプチドヒドロラーゼ)、ペプチド鎖のカルボキシ基をもつ末端に作用するもの(ペプチジルアミノアシドヒドロラーゼ)、さらに生じたジペプチドに作用するもの(ジペプチドヒドロラーゼ)などが挙げられ、具体的には、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、
10 パパイン、コラゲナーゼ、ズブチリシン、カルボキシペプチダーゼ等が挙げられる。本発明では、ペプシン、特に胃ペプシンを使用するのが好ましい。

本発明においては、2種以上の消化酵素を免疫原として使用し、これらに対する2種以上の抗体を含む組成物を使用することが好ましい。2種以上の消化酵素
15 に対する抗体を組み合わせることにより、相乗的な抗肥満効果が得られるからである。消化酵素の組合せとしては、糖質分解酵素とタンパク質分解酵素、糖質分解酵素と脂質分解酵素、タンパク質分解酵素と脂質分解酵素、糖質分解酵素とタンパク質分解酵素と脂質分解酵素等の組合せが挙げられる。特に、糖質分解酵素と脂質分解酵素の組合せが好ましい。また、2種以上の消化酵素とは、例えば、
20 糖質分解酵素に属する、異なる2種の酵素の組合せ (アミラーゼとマルターゼなど) をも意味する。より具体的には、 α -アミラーゼと α -グルコシダーゼ、ペプシンとトリプシン、リパーゼとホスホリパーゼ、 α -アミラーゼとリパーゼ、 α -アミラーゼとペプシン、ペプシンとリパーゼ等の組合せが好ましい。

本発明においては、鶏を2種以上の消化酵素で免疫してもよいし、又は2種以上の消化酵素で鶏をそれぞれ免疫した後、各鶏が産生する卵又はその処理物を混合してもよい。

これらの酵素の起源についても、免疫する鶏において免疫原となりうるものであれば特に制限されず、例えば、哺乳類及び鳥類等の動物種、菌類及び細菌類等の植物種由来の消化酵素を使用できるが、動物、特にブタ由来の消化酵素を使用
30 するのが好ましい。

本発明においては、酵素全体のみならず、その断片も使用することができる。「断片」という用語は、目的タンパク質のアミノ酸配列を含む限り、特に長さに関係なく使用する。

本発明においては、上記のような酵素又はその断片を抗原として鶏を免疫し、

5 該酵素に対する抗体を含有する卵を得るが、使用する酵素は市販のものが入手可能であり、また、当技術分野で公知の手法を用いて供与源から単離・精製して調製することもできる。あるいは、酵素及びその断片は、当該酵素の公知のアミノ酸配列に基づき、遺伝子工学的手法により微生物で產生させて精製することにより調製することもできる。

10 酵素の断片は、ペプチド断片として通常のペプチド合成等により調製することができる。ペプチドの化学合成は常法手段を採用することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれでもよい。なお、本発明においては、市販の自動ペプチド合成装置（例えば島津製作所社の自動ペプチド合成装置PSSM-8）を使用して合成することもできる。

20 本発明で使用するのに適したペプチド断片は、タンパク質の表層にあること、 α -ヘリックス構造をとらないこと、リピート配列等の単純な配列を含まないこと、などを考慮して決定しうる。また、免疫に用いるペプチド配列は、哺乳動物間で非常に類似している可能性があるため、KLH、BSA等の当技術分野で公知のキャリアタンパク質と該ペプチド配列とを結合することにより免疫原性を高めて免疫を行うことが好ましい。

25 前記のようにして作製した酵素又はその断片を抗原として、鶏を免疫する。免疫する鶏としては特に制限されないが、抗体の量産性という観点から、白色レグホン等の卵用種を用いるのが好ましい。鶏以外の鳥類を免疫することもできる。必要に応じてフロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)等のアジュバントを用いることもできる。免疫は、主として静脈内、皮下、筋内、腹腔内に注入することにより行われるが、点鼻、点眼等によっても行うことができる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、30 1～10回の免疫を行う。通常、初回免疫から数週間で投与抗原に対して特異的に

反応する抗体が卵、特に卵黄中に得られる。

卵黄中の抗体価は、酵素免疫吸着法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ等を用いて測定することができ、免疫後に2週程度の間隔で抗体価を測定することにより抗体価の推移を追跡できる。通常、約3箇月間にわたって高抗体価を得ること 5 ができる。なお、免疫後、抗体価の減少が見られた場合、適当な間隔で適宜追加免疫することにより抗体価を高くすることができる。

本発明においては、上記のように免疫した鶏の卵及びその処理物を使用して抗肥満作用を有する酵素阻害剤及び食品等を製造する。本発明において、卵の処理物は、抗原として鶏の免疫に使用した消化酵素に対する抗体を含むものであれば 10 特に制限されず、例えば、免疫した鶏卵の全卵、卵黄及び卵白、これらの卵液、ならびに卵液をプロパノールやクロロホルムを用いて抽出した抽出物等が含まれる。卵黄成分を含むことが好ましい。スプレードライ法や凍結乾燥法などにより粉末化したものも含まれる。また、卵黄からヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸などを用いる方法により 15 卵黄脂質成分を除去した後粉末化したものも含まれる。さらに、本発明において卵処理物には、硫酸アンモニウム塩析、硫酸ナトリウム塩析、低温エタノール沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティーコロマトグラフィーなどの公知の方法により、卵及び上記卵処理物から精製された抗体自身をも包含する。このように調製された抗体を鶏卵抗体という。処理物の保存性 20 を高めるためには、殺菌した全卵液卵又は卵黄液卵をスプレードライ又は凍結乾燥して粉末化するのが好ましい。

本発明の卵及びその処理物の、消化酵素阻害活性は、例えば、Caraway 法など当技術分野で公知の方法によって測定できる。上記方法によって活性を測定したところ、消化酵素に対する抗体を含む本発明の卵及びその処理物は、有意 25 な酵素阻害活性を有することが明らかとなった。

従って、本発明の卵及びその処理物を、食品及び健康食品に配合し、食品添加物の成分とすることにより、抗肥満効果を有する食品を製造することができる。本発明の卵及び処理物を使用する食品は、特に制限されないが、通常の製法において卵を含有する食品、例えば、ヨーグルト、プリン、アイスクリーム、キャンディ、ガム及びマヨネーズ等が好ましい。抗肥満効果を有する健康食品の製造に 30

において使用するのも好ましい。一般食品に対して配合する場合は、食品に対して、粉末状の有効成分の場合、0.001～15重量%、特に0.1～5重量%配合することが好ましいが、食品の種類によって上記の範囲よりも少なく又は多く配合することができる。

5 また、本発明の消化酵素に対する抗体は、消化酵素の活性を阻害する活性を有することから糖質、タンパク質及び脂質の消化を阻害する効果を有する医薬組成物の製造に使用することができる。糖質分解酵素に対する抗体を用いて、糖質分解酵素阻害剤、糖質吸収阻害剤、血糖値上昇抑制剤等を製造することができ、また、脂質分解酵素に対する抗体を用いて、脂質分解酵素阻害剤、抗高脂血症剤、
10 血中トリグリセリド低下剤、コレステロール低下剤等を製造することができる。さらに、タンパク質分解酵素に対する抗体を用いて、タンパク質分解酵素阻害剤、高タンパク質症抑制剤等を製造することができる。また、これらの製剤のそれぞれ及び組合せはいずれも、消化酵素阻害活性を有することに基づき、抗肥満作用を有する。本明細書において、抗肥満作用とは、身体に脂肪が過剰に蓄積するの
15 を防止する作用、また、過剰に蓄積した脂肪を減少させる作用を意味する。

本発明の酵素に対する抗体を含有する卵及び抗体を含めたその処理物は、通常の製剤化法により、そのままあるいは慣用の添加剤と共に、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、液剤などの経口用製剤とすることができます。添加剤には、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤などがあり、必要に応じて使用する。小腸部位で長時間作用できるように徐放化するためには、既知の遅延剤等でコーティングすることもできる。賦形剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、軽質無水ケイ酸、ゼラチン、結晶セルロース、ソルビトール、タルク、デキストリン、デンプン、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、メタ珪酸アルミニン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム等が使用できる。結合剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、エタノール、エチルセルロース、カゼインナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、精製水、ゼラチン、デンプン、トラガント、乳糖、ヒドロキセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチ

ルセルロースカルシウム、結晶セルロース、デンプン、ヒドロキシプロピル starch 等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油、ショ糖脂肪酸エステル、ロウ類等が挙げられる。抗酸化剤としては、トコフェロール、没食子酸エステル、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、アスコルビン酸等が挙げられる。さらに、必要に応じてその他の添加剤や薬剤、例えば制酸剤 (炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、合成ヒドロタルサイト等)、胃粘膜保護剤 (合成ケイ酸アルミニウム、スクラルファート、銅クロロフィリンナトリウム等) を加えてもよい。

上記の消化酵素阻害剤、抗肥満剤等の製剤を投与しうる対象としては、これらの製剤に含まれる抗体に対する抗原となる消化酵素を有する動物であれば特に制限されず、哺乳類、鳥類等が挙げられる。特に、ヒト及び愛玩動物、例えば、イヌ、ネコに対し好適に使用される。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例3において、抗胰アミラーゼ鶏卵黄精製抗体又は非免疫鶏卵黄精製抗体を投与したラットの血中グルコース含量を表したものである。

図 2 は、実施例3において、デンプン負荷後のラットに、抗胰アミラーゼ鶏卵黄精製抗体又は非免疫鶏卵黄精製抗体を投与した後の血中インスリン含量を表したものである。

図 3 は、実施例6において、抗胰リバーゼ鶏卵黄精製抗体含有脂肪溶液又は非免疫鶏卵黄精製抗体含有脂肪溶液を投与したラットの血中の血漿トリグリセリド値を表したものである。

図 4 は、実施例7において、抗胰アミラーゼ鶏卵黄精製抗体の単独、抗胰リバーゼ鶏卵黄精製抗体の単独、両抗体を等量で混合したもの、又は非免疫鶏卵黄精製抗体を混餌投与したラット群の体重増加を表したものである。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2003-106670号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 抗糖質分解酵素鶏卵抗体の調製

(1) ブタ臍アミラーゼ

本実施例では、糖質分解酵素として、ブタの臍より精製した α -アミラーゼを用いた。免疫抗原、ELISA用固相化抗原及び実施例で用いたブタ臍アミラーゼはELASTIN PRODUCTS CO., INC. (Missouri, USA) より入手した。使用したブタ臍アミラーゼの酵素活性は、1,5000unit/mgタンパク質であった。

(2) 抗臍アミラーゼ鶏卵抗体の製造

免疫する鶏としては、18週齢前後の白色レグホン種、ハイラインW77系群を用いた。(1)で入手したブタ臍アミラーゼを0.5mg/mL (7500unit/mL) に調整し、油性アジュバントと混和した後、左右の胸筋内に0.5mLずつ注射した(初回免疫)。その8週後に追加免疫として2倍量(1.0mg/mL (15,000unit/mL))の抗原で免疫した。免疫した鶏の産生する卵黄中の抗体価を測定し、抗体価が有意に上昇して安定した追加免疫の2週後から集卵を開始し、4週間集卵を続けた。尚、卵黄中の抗体価は4~6ヶ月間安定していた。その後、抗体価が低下したので、追加免疫と同様の方法で注射したところ、元の抗体価レベルまで回復した。なお、鶏卵中の抗体価は以下の方法で測定した。

(3) 鶏卵卵黄中の抗臍アミラーゼ抗体の抗体価測定

免疫卵を割卵して卵黄を取り出した後、重量を計り、これに等量のPBSを加えて卵黄液成分をよく溶解し、この混合物に対して等量のクロロホルムを加え、激しく振とう攪拌した後、遠心して上清を得た。この上清を抗体価測定用試料とした。抗体価の測定はELISAによって行った。方法は以下に示した通りであるが、固相化抗原(ブタ臍アミラーゼ)並びにアルカリホスファターゼ標識抗ニワトリIgG複合体は交差力価測定を行うことにより、至適濃度を設定した。プレートは96ウェルのImmilon 2プレート(Dynex)を用い、固相化にはブタ臍アミラーゼを用いた。抗原は蛋白量が5.0 μ g/mLになるように炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、1ウェルあたり50 μ Lずつ加え、+4°Cで18時間静置した。使用時にはPBS-Tweenで各ウェルを3回洗浄した後、ブロッキングのため3.0%BSA溶液を150 μ Lずつ加え、37°Cで60分静置した。次に、各ウェルをPBS-Tweenで3回洗浄した後、各試料をウェルあたり50 μ Lずつ加え、37°Cで60分反応させた。反応後、再びPBS-Tweenで洗

5 淨し、2,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ニワトリIgG複合体をウェル当たり50 μ Lずつ加え、再び37°Cで60分反応させた。ウェルを5回洗浄した後、基質（p-ニトロフェニルホスフェート）を加えて37°Cで発色させ、15分後に反応停止液（2M NaOH）をウェル当たり50 μ Lずつ添加して反応を停止させた。その後、各ウェルの吸光度(410nm)をELISAオートリーダーで測定した。試料の抗体価は最終的に陽性ならびに陰性対照の吸光度を基準にして補正して求めた。

(4) 鶏卵卵黄精製抗体の調製

10 免疫卵を水洗、消毒後、割卵機にて卵黄を分離し、8.0kgずつ小分けして使用時まで-20°C以下に保存した。精製は以下に示した方法により実施した。すなわち、卵黄7.5kgを出発材料とし、卵黄重量に対し10倍量の精製水を加えて脱脂した。上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌し、遠心によりペレットを得た。ペレットを生理的食塩水で溶かし、再び30%飽和塩析によりペレットを得た。このペレットを少量の生理的食塩水で溶解し、これに最終濃度が50%になるように攪拌しながら、-20°Cに冷却したエタノールを徐々に加えた。遠心後、ペレットを生理的食塩水で溶かし、凍結乾燥した。その結果、淡黄白色の粉末が11g得られた。抗体の回収率は47%前後、IgG純度は95%以上、水分含量は2.0%以下であった。尚、以下の実施例はこの抗肺アミラーゼ鶏卵黄精製抗体を用いて実施した。また、非免疫鶏より入手した鶏卵より同様の処置により非免疫鶏卵黄精製抗体を得、以下の実施例において陰性対照として用いた。

20

実施例2 アミラーゼ活性阻害試験

アミラーゼ活性阻害率は、ヒト肺 α -アミラーゼ (ELASTIN PRODUCTS CO., INC. Missouri, USA) 及び和光純薬工業製の「アミラーゼーテストワコー」を用いて測定した。抗肺アミラーゼ鶏卵黄精製抗体及び非免疫鶏卵黄精製抗体溶液と酵素溶液（ヒト肺アミラーゼ0.05mg/mL）を等量混合した。また、陽性対照としては抗体を含有していない緩衝液と酵素溶液を同様に処置して用いた。その後、これらのサンプルの酵素活性を「アミラーゼーテストワコー」を用いて測定した。方法としては、基質緩衝液（0.25Mリン酸緩衝液(pH7.0)、可溶性デンプン400 μ g/mL）1.0mLを37°Cで5分間予熱した後、上記の混合液を20 μ L添加し、37°Cで7分30秒間反応させる。その後、発色液（0.01Nヨウ素液）を1.0mL添加した後、蒸留

水を5.0mL加える。陰性対照として、混合液の代わりに蒸留水を用いた。それぞれのサンプルの吸光度を波長660nmで測定する。アミラーゼ活性阻害率は、次式を用いて計算した。

$$\text{アミラーゼ活性阻害率} = [1 - (\text{AC} - \text{AT}) / (\text{AC} - \text{AP})] \times 100$$

5 AT: サンプルの吸光度

AP: 陽性対照の吸光度

AC: 陰性対照の吸光度

結果

アミラーゼの酵素活性に対する各々の抗体の50%阻害濃度 (IC_{50}) を表1に示

10 した。

表1

	IC_{50} (mg/mL)
抗胰アミラーゼ鶏卵抗体	0.003
非免疫鶏卵抗体	>1.0

表1の抗胰アミラーゼ抗体は優れたアミラーゼ活性阻害効果を有している。上記の抗体は生体内で糖質の消化吸収を担い、糖尿病の鍵を握る消化酵素である胰アミラーゼに対して活性阻害作用を示し、体内への糖質の蓄積を抑える事により糖尿病及び肥満の抑制や予防に寄与し得る。

実施例3 デンプン負荷試験

20 デンプン負荷後の約6週齢のWister系雄ラット20匹を2群に分け、試験群では実施例1(4)で得られた抗胰アミラーゼ鶏卵黄精製抗体の1.0%溶液を1.0mL単回投与し、対照群には非免疫鶏卵黄精製抗体を同量強制経口投与した。投与後、1時間目、2時間目及び3時間目に採血し、血中のグルコース含量ならびにインスリン含量を測定した。

25

結果

実験結果を図1及び2に示した。以上の結果から、本発明の α -アミラーゼの酵素活性を阻害する鶏卵黄精製抗体投与群は対照群に比較し、血中グルコース濃度

ならびにインスリン濃度が顕著に低値であった。このことから、本発明の抗体は消化酵素の機能を阻害することにより、炭水化物の体内への取り込みが制限され、血糖の上昇が抑制されると考えられる。この結果、抗肥満、抗糖尿病を目的とする医薬品又は健康食品への使用が期待される。

5

実施例4 抗臍リパーゼ鶏卵抗体の調製

(1) 脍リパーゼ

臍リパーゼについては、ブタの臍臓より精製したリパーゼを用いた。免疫抗原、ELISA用固相化抗原及び実施例で用いたブタ臍リパーゼはELASTIN PRODUCTS CO., INC. (Missouri, USA) より入手した。その酵素活性は45,000unit/mgタンパク質であった。

(2) 抗臍リパーゼ鶏卵抗体の製造

免疫には18週齢前後の白色レグホン種、ハイラインW77系群を用いた。(1)で入手したブタ臍リパーゼを0.5mg/mL (22,500unit/mL) に調整し、油性アジュvantと混和した後、左右の胸筋内に0.5mLずつ注射した(初回免疫)。その8週後に追加免疫として2倍量 (1.0mg/mL (45,000unit/mL)) の抗原を免疫し、卵黄中の抗体価が有意に上昇して安定した、追加免疫2週後から集卵を開始し、4週間卵を集めた。尚、卵黄中の抗体価は4~6ヶ月間安定していた。その後、抗体価が低下したので、追加免疫と同様の方法で注射したところ、元の抗体価のレベルまで回復した。

(3) 鶏卵卵黄中の抗臍リパーゼ抗体の抗体価測定

免疫卵を割卵して卵黄を取り出した後、重量を計り、これに等量のPBSを加えて卵黄液成分をよく溶解し、この混合物に対して等量のクロロホルムを加え、激しく振とう攪拌した後、遠心して上清を得た。この上清を抗体価測定用試料とした。抗体価の測定はELISAによって行った。方法は以下に示した通りであるが、固相化抗原(ブタ臍リパーゼ)並びにアルカリホスファターゼ標識抗ニワトリIgG複合体は交差力価測定を行うことにより、至適濃度を設定した。プレートは96ウェルのImmilon 2プレート(Dynex)を用い、固相化にはブタ臍リパーゼを用いた。抗原は蛋白量が5.0 μg/mLになるように炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、1ウェルあたり50 μLずつ加え、+4°Cで18時間静置した。使用時にはPBS-Tweenで各

ウェルを3回洗浄した後、ブロッキングのため3.0%BSA溶液を150 μ Lずつ加え、37°Cで60分静置した。次に、各ウェルをPBS-Tweenで3回洗浄した後、各試料をウェルあたり50 μ Lずつ加え、37°Cで60分反応させた。反応後、再びPBS-Tweenで洗浄し、2,000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ニワトリIgG複合体をウェル当たり50 μ Lずつ加え、再び37°Cで60分反応させた。ウェルを5回洗浄した後、
5 基質 (p-ニトロフェニルホスフェート) を加えて37°Cで発色させ、15分後に反応停止液 (2M NaOH) をウェル当たり50 μ Lずつ添加して反応を停止させた。その後、各ウェルの吸光度(410nm)をELISAオートリーダーで測定した。試料の抗体価は最終的に陽性ならびに陰性対照の吸光度を基準にして補正して求めた。

10 (4) 抗肺リパーゼ鶏卵精製抗体の調製

免疫卵を水洗、消毒後、割卵機にて卵黄を分離し、8.0kgずつ小分けして使用時まで-20°C以下に保存した。精製は以下に示した方法により実施した。すなわち、卵黄7.5kgを出発材料とし、卵黄重量に対し10倍量の精製水を加えて脱脂した。上清に40%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌し、遠心により
15 ペレットを得た。ペレットを生理的食塩水で溶かし、再び30%飽和塩析によりペレットを得た。このペレットを少量の生理的食塩水で溶解し、これに最終濃度が50%になるように攪拌しながら、-20°Cに冷却したエタノールを徐々に加えた。遠心後、ペレットを生理的食塩水で溶かし、凍結乾燥した。その結果、淡黄白色の粉末が11g得られた。抗体の回収率は47%前後、IgG純度は95%以上、水分含量は
20 2.0%以下であった。尚、以下の実施例はこの抗肺リパーゼ鶏卵黄精製抗体を用いて実施した。また、非免疫鶏より入手した鶏卵より同様の処置により非免疫鶏卵黄精製抗体を得、以下の実施例において陰性対照として用いた。

実施例5 リパーゼ活性阻害試験

25 リパーゼ活性阻害率は、ヒト肺リパーゼ (ELASTIN PRODUCTS CO., INC. Missouri, USA) 及び大日本製薬製の「リパーゼキットS」を用いて測定した。抗肺リパーゼ鶏卵黄精製抗体及び非免疫鶏卵黄精製抗体溶液と酵素溶液 (ヒト肺リパーゼ0.05mg/mL) を等量混合した。また、陽性対照としては抗体を含有していない緩衝液と酵素溶液を、及び陰性対照としては蒸留水を、同様に処置して用いた。その後、これらのサンプルを「リパーゼキットS」を用いて酵素活性を測

定した。方法としては、発色液 (5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸 (DTNB)) を0.1mg/mL含む緩衝液) 1mLに混合液100μLを添加した後、エステラーゼ阻害剤 (3.48mg/mLフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)) 20μLを添加し、混和した。これらを30°Cで5分間予熱し、基質液 (三酪酸ジメルカプロール (BALB) 6.69mg/mL + ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 5.73mg/mL) 100μLを加え混和後、遮光下にて30°Cで30分間反応させた。その後、反応停止液2.0mLを添加し反応を停止した。プランクは各サンプル、発色液及びエステラーゼ阻害剤を混合した後に、30°Cで5分及び30°Cで30分間反応させ、反応停止液を加えた後に基質液を添加した。それぞれのサンプルの吸光度を波長410nmで測定した。リバーゼ活性阻害率は、次式を用いて計算した。

$$\text{リバーゼ活性阻害率} = [1 - (AC - AB_t) / (AC - AB_c)] \times 100$$

AT: サンプルの吸光度

ABt: サンプルのプランク吸光度

AC: 陰性対照の吸光度

15 ABC: 陰性対照のプランク吸光度

結果

リバーゼの酵素活性に対する各々の抗体の50%阻害濃度 (IC₅₀) を表2に示した。表2で示した通り抗臍リバーゼ鶏卵黄精製抗体は優れたリバーゼ活性阻害効果を有している。本抗体は生体内で脂質の消化吸収を担い、肥満に伴う高脂血症等の疾患の鍵を握る消化酵素である臍リバーゼに対して酵素活性阻害作用を示し、体内への脂質の蓄積を抑える事によりこれらの疾患の予防に寄与し得る。

表2

	IC ₅₀ (mg/mL)
抗臍リバーゼ鶏卵黄精製抗体	0.001
非免疫鶏卵黄精製抗体	>1.0

25 実施例6 脂肪吸収阻害作用試験

実施例4 (4) で得られた抗臍リバーゼ鶏卵黄精製抗体及び非免疫鶏卵黄精製抗体を10mg/mLの濃度になるようにコーンオイルに溶解し、超音波処理を行い、各々試験溶液及び対照溶液を得た。食品中の脂肪が胆汁酸やリン脂質と共に形成

した油滴（ミセル）に対して消化酵素である臍リパーゼが作用し、脂肪が分解吸収されることから、当該滴成分に相当する基質溶液として、コーンオイルを主成分とする下記の成分組成からなる溶液を超音波処理することで所望の脂質溶液を調製した。

5

表3 脂質溶液組成

成 分	含 量
コーンオイル	6.0mL
コレステロールオレアート	2.0g
コール酸	80mg
精製水	6.0mL

約6週齢のWister系雄ラットを10匹ずつ2群に分け、試験群には抗臍リパーゼ鶏卵黄精製抗体含有脂肪溶液1.0mL、また対照群には非免疫鶏卵黄精製抗体含有脂肪溶液を同量ずつ強制経口投与した。投与後、経時的に採血し、血中の血漿トリグリセリド値を大日本製薬製のリパーゼキットSを用いて測定することにより、脂肪の腸管吸収抑制効果を実証した。

結果

得られた脂肪吸収抑制効果の結果を図3に示した。抗臍リパーゼ鶏卵黄精製抗体を含有する脂肪溶液を投与した群では、いずれもコーンオイル負荷による血漿トリグリセリド値の上昇が抑制された。この結果から、本発明の臍リパーゼの酵素活性を阻害する鶏卵黄精製抗体の経口投与は有意に脂肪吸収を抑制することが明らかとなった。

20 実施例7 抗臍アミラーゼ鶏卵黄精製抗体及び抗臍リパーゼ鶏卵黄精製抗体の肥満抑制効果及びそれらの相乗効果

実施例1（4）及び実施例4（4）で得られた、抗臍アミラーゼ鶏卵黄精製抗体及び抗臍リパーゼ鶏卵黄精製抗体を用いて肥満抑制試験を実施した。試験には約6週齢のWister系雄性ラット80匹を用い、MF飼料（粉末）（オリエンタル酵母）にコーンオイル及びデンプンを10%の濃度で混合し自由に摂取させた。試験群として各群20匹として、抗臍アミラーゼ鶏卵黄精製抗体あるいは抗臍リパーゼ鶏卵黄精

製抗体を0.1%、また両抗体を0.05%ずつ混合した群を設け、混餌投与した。また、陽性対照群として非免疫鶏卵黄精製抗体を用いて同様の処置を行った。さらに、陰性対照群として、コーンオイル及び抗体のいずれも添加しないMF飼料のみを与えた飼育した。試験期間は14週間とし、体重を測定した。結果を図4に示す。

5 結果

抗体投与群の3群は各群とも対照群と比較して体重の増加が抑制されたが、抗脾アミラーゼ鶏卵黄精製抗体と抗脾リパーゼ鶏卵黄精製抗体の混合の群は単独の2群と比較しても増加が抑制されており、併用による著しい増加抑制が確認された。

10

実施例8 抗脾アミラーゼ鶏卵抗体及び抗脾リパーゼ鶏卵抗体の安全性試験（単回投与毒性試験）

F344/DuCrj雌雄ラット（6週齢）を使用して、医薬品のための毒性試験法ガイドライン（「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成9年3月26日厚生省令第21号））に準じ、単回投与毒性試験を行った。すなわち、生理食塩水に、それぞれ実施例1(4)及び実施例2(4)で調製した抗脾アミラーゼ鶏卵精製抗体もしくは抗脾リパーゼ鶏卵精製抗体、又はそれらを等量の割合で混合したものを200mg/mLとなるよう懸濁し、この懸濁液をラットに、上記ガイドラインにおける最高用量である2,000mg/体重kgで強制経口投与し、7日間観察した。その結果、全ての群において死亡例はなく、また臨床症状及び体重においてもなんら異常は認められなかった。また、病理学的検査においてもなんら異常は観察されなかった。従って、本発明に用いられる抗脾アミラーゼ鶏卵抗体及び抗脾リパーゼ鶏卵抗体は、単独又は併用のどちらで使用しても極めて安全性が高いことが確認された。

25

実施例9 抗脾アミラーゼ鶏卵黄精製抗体及び抗脾リパーゼ鶏卵黄精製抗体の安全性試験（単回投与毒性試験）

体重29～32gのICR/Crj雄マウス（5週齢）（1群5匹）を使用して、医薬品のための毒性試験法ガイドライン（昭和59年2月15日薬審第118号、都道府県衛生主管部局長宛厚生省業務局審査第2課長通知）に準じ、単回投与毒性試験を行った。

すなわち、生理食塩水にそれぞれ実施例1 (4) 及び実施例4 (4) で調製した抗脾アミラーゼ鶏卵黄精製抗体又は抗脾リパーゼ鶏卵黄精製抗体、又はそれらを等量の割合で混合したものを30mg/mLとなるよう懸濁し、この懸濁液をマウスに、体重30gあたり0.5mL (500mg/体重kg) の割合で強制経口投与し、14日間観察した。その結果、全ての群において全例とも死亡動物はなく、また副作用も認められず、14日目に剖検においても、組織及び臓器の顕微鏡的異常はなんら観察されなかつたことから、本発明に用いられる抗脾アミラーゼ鶏卵黄精製抗体及び抗脾リパーゼ鶏卵黄精製抗体は、単独、又は併用しても極めて毒性が低いことが分かる。

10 製造例1 アイスクリーム

	处方A	处方B
無塩バター	7.0%	7.0%
全乳練乳	10.0%	10.0%
牛乳	35.0%	35.0%
15 脱脂粉乳	0.5%	3.0%
グラニュー糖	4.0%	4.0%
75%ブリックス水飴	14.0%	14.0%
乳化安定剤	0.5%	0.5%
本発明の卵黄液卵	3.0%	—
20 本発明の全卵液卵	—	0.5%
水	26.0%	26.0%
香料	適量	適量

25 製造例2 キャンディー

冷凍濃縮みかん果汁	5.0%
果糖ブドウ糖液糖	11.0%
クエン酸	0.2%
L-アスコルビン酸	0.02%
香料	0.2%
30 色素	0.1%

本発明の全卵粉末	0. 2%
水	83. 28%

製造例3 チョコレート

5 チョコレート	45. 0%
ショ糖	15. 0%
カカオバター	20. 0%
全脂粉乳	19. 9%
本発明の全卵粉末	0. 1%

10

製造例4 飲料

本発明の脱脂全卵粉末	1g
キシリトール	10g
ビタミンB ₁ 塩酸塩	0. 5mg
15 ビタミンB ₂	0. 2mg
ビタミンC	500mg
ナイアシン	1. 0g
パントテン酸カルシウム	0. 2mg
水	100ml

20

製造例5 錠剤

卵殻カルシウム	108g
ピロリン酸第二鉄	2g
アスコルビン酸	40g
25 微結晶セルロース	40g
還元麦芽糖	285g
本発明の全卵粉末	0. 5g
混和後打錠	

30

製造例6 乾燥スープ

鶏卵	3.6g
肉エキス	1.0g
オニオンエキス	1.7g
5 キャロットペースト	2.1g
昆布エキス	0.1g
乳化剤	0.1g
食塩	0.2g
香料 (レッドペッパー)	0.2g
10 調味料 (アミノ酸等)	0.2g
本発明の全卵粉末	0.8g

製造例7 健康食品

処方例A (細粒) 100g中

15 本発明の脱脂全卵粉末	45g
乳糖 (200M)	35g
トウモロコシデンプン	15g
PVP (K-30)	5g

上記成分をとり、湿式造粒法を用いた通常の方法により細粒を得た。

20 処方例B (顆粒) 100g中

本発明の脱脂全卵粉末	33g
乳糖 (200M)	44g
トウモロコシデンプン	18g
PVP (K-30)	5g

25 上記成分をとり、押し出し造粒法で通常の方法により顆粒剤を得た。

製造例8 医療用食品

処方例A 流動食 (200ml/パック)

本発明の脱脂全卵粉末	2.6%
30 マルトデキストリン	39.0%

	カゼインNa	13. 0%
	植物油	12. 0%
	ビタミン類	1. 0%
	ミネラル類	1. 5%
5	乳化剤	0. 2%
	乳タンパク	10. 3%
	リン酸Na	1. 8%
	リン酸K	1. 2%
	香料	0. 5%
10	安定剤 (カラギーナン)	1. 5%
	水	残量
	処方例B ドリンク剤 (スープタイプ)	
	本発明の脱脂全卵粉末	2. 5%
	人参 (キャロットペースト)	10. 0%
15	生クリーム	12. 0%
	乳糖	1. 8%
	玉葱 (オニオングエキス)	1. 5%
	乳タンパク末	0. 5%
	乳果オリゴ糖	1. 5%
20	コンソメパウダー	0. 5%
	小麦胚芽	0. 5%
	卵殻カルシウム	0. 2%
	乳清カルシウム	0. 1%
	食塩	0. 2%
25	乳化剤	0. 2%
	水	残量

製造例9 チューブインガム

	ガムベース	200g
30	砂糖	600g

ブドウ糖	80g
水飴	100g
グリセリン	5g
香料	10g
5 本発明の全卵粉末	5g

製造例10 ミルクプリン

脱脂粉乳	5. 0%
砂糖	2. 0%
10 全脂練乳	10. 0%
本発明の卵黄液卵	3. 0%
ヤシ油	3. 0%
食塩	0. 04%
ゲル化剤	0. 45%
15 乳化剤	0. 1%
水	74. 2%
フレーバー	適量
色素	適量

20 産業上の利用の可能性

本発明により、消化酵素に対する特異的な抗体を安価かつ大量に得ることができ、これらの抗体は精製も容易である。さらに、上記抗体ならびに該抗体を含む卵及びその処理物から、高度な基質特異性を有する消化酵素阻害剤を安価に製造することができ、この酵素阻害剤は毒性もない。また、本発明の卵及びその処理物を使用して、抗肥満作用を有する食品を安価に製造することもできる。さらに2種以上の消化酵素を免疫原として產生された本発明の抗体を含む組成物は、相乗的な効果を有し、非常に効果的な抗肥満剤として使用できる。そして、本発明の抗体が有する消化酵素阻害効果及び各抗体の作用の相乗的効果により、糖質吸収阻害作用、血糖上昇抑制作用、抗脂血症作用、抗動脈硬化作用、血中トリグリセリド低下作用及びコレステロール低下作用をもたらすことができる。

請 求 の 範 囲

1. 消化酵素又はその断片で免疫した鶏が產生した卵又はその処理物を含む組成物であって、該消化酵素が2種以上の消化酵素を含む該組成物。
- 5 2. 2種以上の消化酵素又はその断片で免疫した同一の鶏が產生した卵又はその処理物を含む請求の範囲第1項に記載の組成物。
3. 少なくとも1種の消化酵素又はその断片で免疫した鶏が產生した卵又はその処理物と、該消化酵素とは異なる消化酵素又はその断片で免疫した鶏が產生した卵又はその処理物とを混合してなる請求の範囲第1項に記載の組成物。
- 10 4. 消化酵素が、糖質分解酵素、脂質分解酵素及びタンパク質分解酵素からなる群から選択される請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の組成物。
5. 卵の処理物が抗体である請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の組成物。
6. 請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の組成物を含む消化酵素阻15 害剤。
7. 請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の組成物を含む抗肥満剤。
8. 請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の組成物を含む食品。

Fig. 1

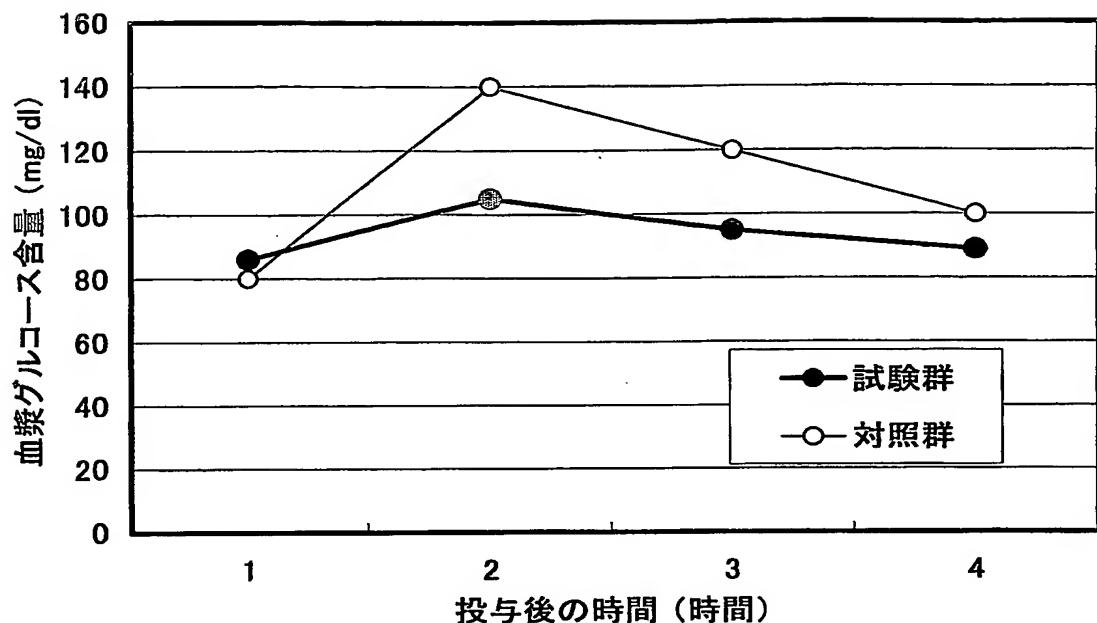


Fig. 2

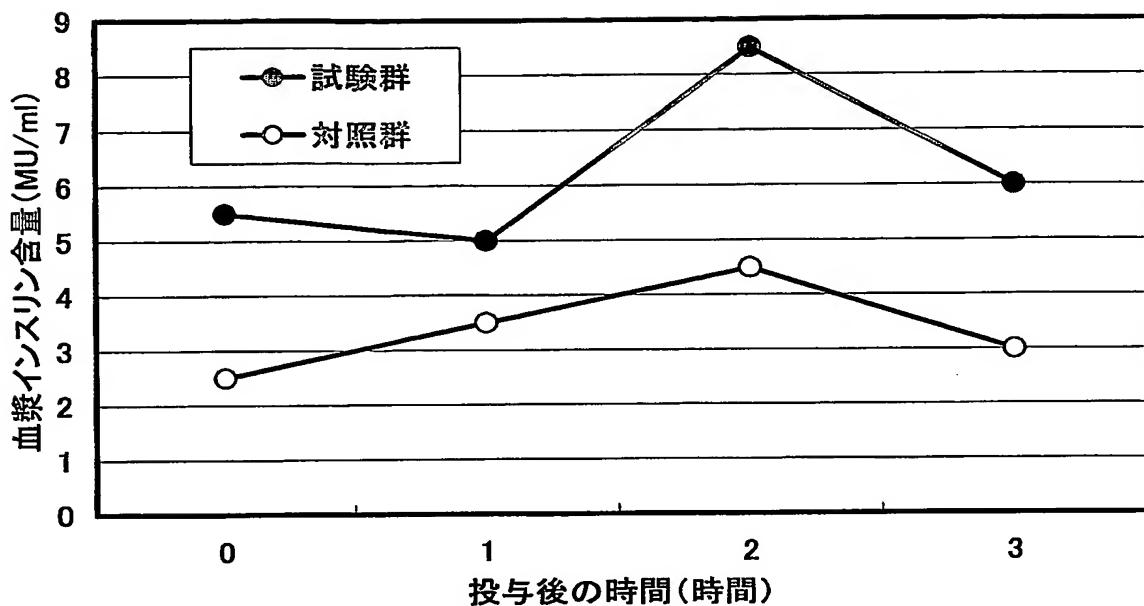


Fig. 3

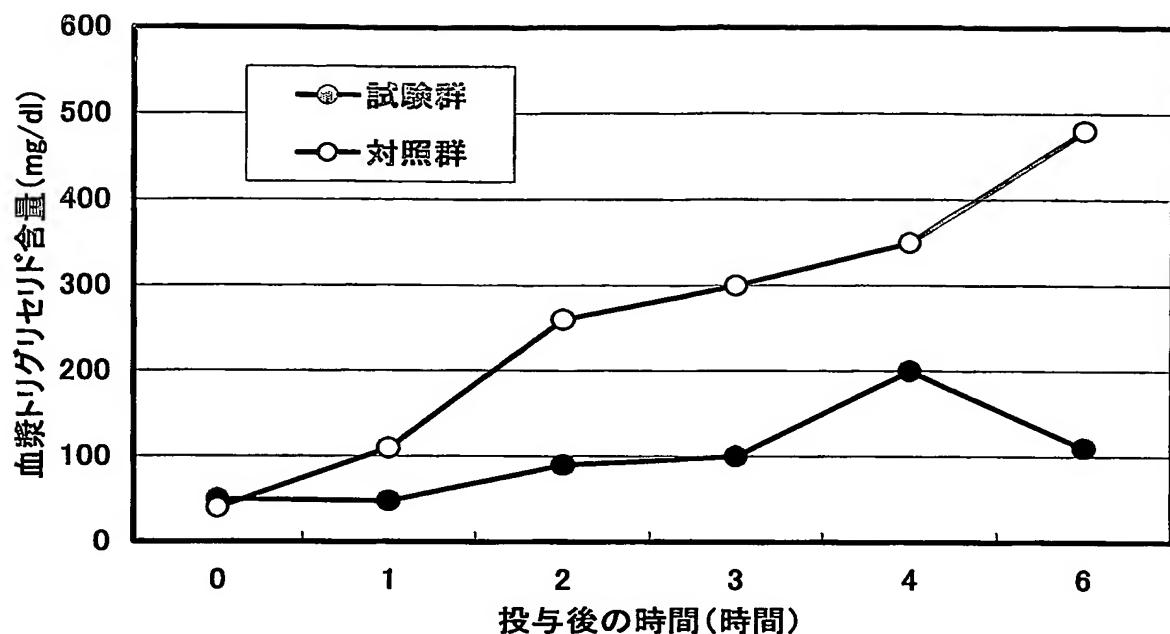
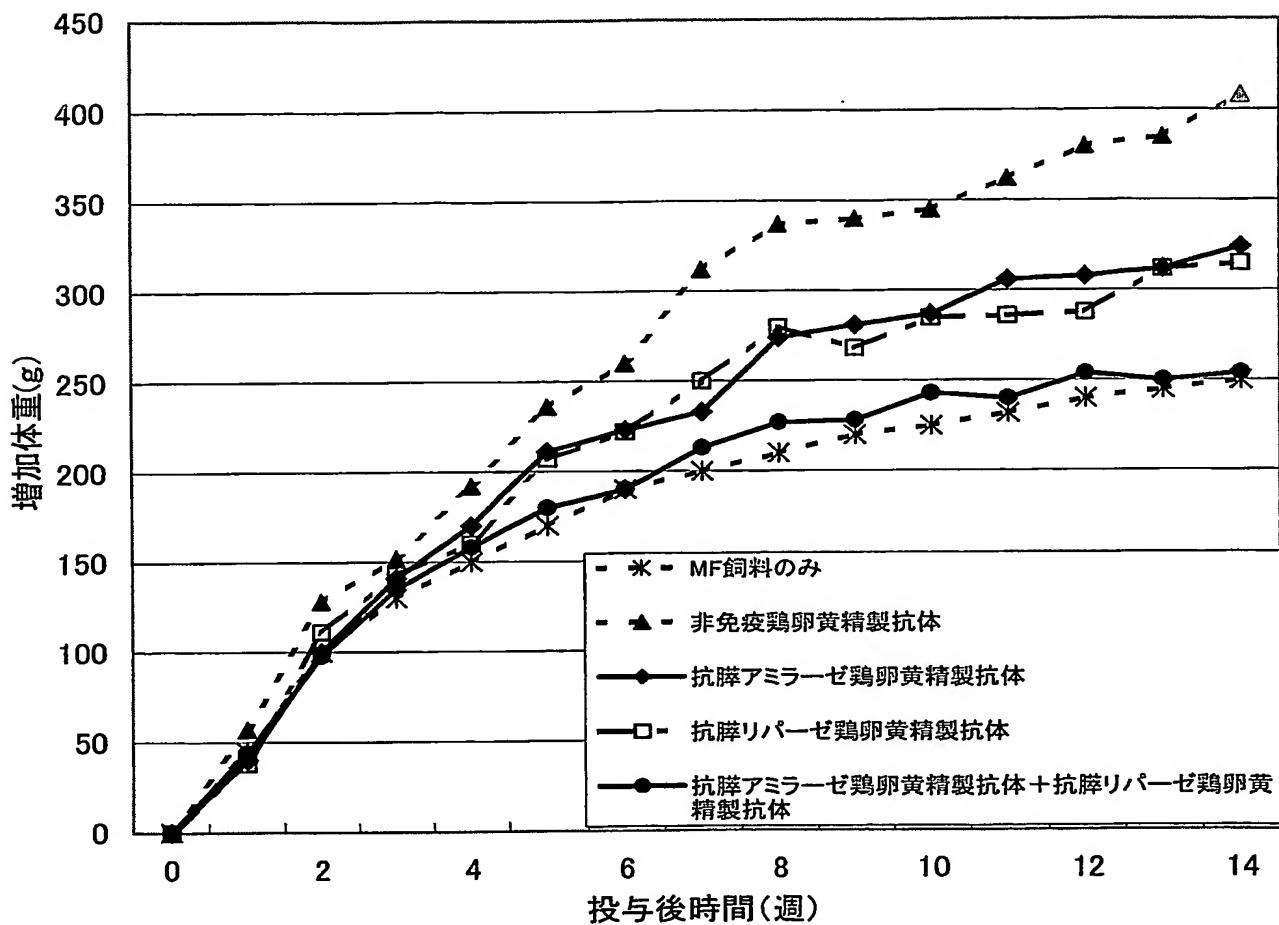


Fig. 4

ラットにおける肥満抑制効果



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K35/54, A61K39/395, A61P3/04, A23L1/32, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/54, A61K39/395, A61P3/04, A23L1/32, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	KR 2003/68728 A (BIOLAB CO., LTD.), 25 August, 2003 (25.08.03), Full text (Family: none)	1-8
X	KR 2003/26046 A (BIOLAB CO., LTD.), 31 March, 2003 (31.03.03), Full text (Family: none)	1-8
Y	JP 2001-525314 A (XIMED GROUP PLC.), 11 December, 2001 (11.12.01), Full text; Claims 1, 26, 28 to 31; examples 1 to 10 & WO 99/2187 A1 & AU 9882326 B & EP 1001809 A1	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 July, 2004 (06.07.04)Date of mailing of the international search report
27 July, 2004 (27.07.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005006

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	JP 2003-259884 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 September, 2003 (16.09.03), Full text; Claims 21, 30, 32; Par. Nos. [0006], [0150] (Family: none)	1-8
P, Y	JP 2003-192695 A (Fancl Corp.), 09 July, 2003 (09.07.03), Full text (Family: none)	1-8
Y	JP 2002-27979 A (The Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), 29 January, 2002 (29.01.02), Full text (Family: none)	1-8
Y	JP 8-12584 A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96), Full. text; Par. Nos. [0002], [0040] (Family: none)	1-8
Y	JP 58-225026 A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 December, 1983 (27.12.83), Full text; page 2, upper left column, lines 9 to 15 (Family: none)	1-8
Y	JP 2-121908 A (Kabushiki Kaisha Ghen Corp.), 09 May, 1990 (09.05.90), Full text (Family: none)	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005006

<Statement in claims and description>**(1)**

Among the compositions as specified in claims, specific data based on EXAMPLES cannot be proved concerning those containing components derived from an egg laid by a hen having been immunized by two or more "digestive enzymes or fragments thereof" for an individual, as specified in, for example, claim 2. Thus, they are neither fully supported by the description in the meaning within PCT Article 6 nor sufficiently disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5.

(2)

Among the compositions as specified in claims, those wherein a digestive enzyme fragment is employed as an immunogen for a hen are neither fully supported by the description in the meaning within PCT Article 6 nor sufficiently disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K35/54, A61K39/395, A61P3/04, A23L1/32, A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K35/54, A61K39/395, A61P3/04, A23L1/32, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAP(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, Y	KR 2003/68728 A (BIOLAB CO LTD) 2003.08.25 (ファミリーなし)	文献全体 1-8
X	KR 2003/26046 A (BIOLAB CO LTD) 2003.03.31 (ファミリーなし)	文献全体 1-8
Y		1-8

[X] C欄の続きにも文献が列挙されている。

 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.07.2004

国際調査報告の発送日

27.7.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4 C 8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 2001-525314 A (ザイメント・グループ・ピーエルシー) 2001.12.11 文献全体、請求項1, 26, 28-31、実施例1-10 & WO 99/2187 A1 & A U 9882326 B & EP 1001809 A1	1-8
P, Y	JP 2003-259884 A (協和醸酵工業株式会社) 2003.09.16 文献全体、請求項21, 30, 32、【0006】、【0150】 (ファミリーなし)	1-8
P, Y	JP 2003-192695 A (株式会社ファンケル) 2003.07.09 文献全体 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2002-27979 A (日本合成化学工業株式会社) 2002.01.29 文献全体 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 8-12584 A (株式会社ヤクト本社) 1996.01.16 文献全体、【0002】、【0040】 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 58-225026 A (持田製薬株式会社) 1983.12.27 文献全体、p.2左上欄第9-15行 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2-121908 A (株式会社ゲン・コーポレーション) 1990.05.09 文献全体 (ファミリーなし)	1-8

<請求の範囲・明細書の記載について>

(1)

請求の範囲に規定される組成物のうち、請求項2に規定されているような、同一個体に対し2種以上の「消化酵素又はその断片」で免疫してなる鶏が産生した卵由来の成分を含むものについては、実施例に基づく具体的なデータが確認できず、PCT6条の意味において明細書中で十分な裏付けがなされているとはいえないし、PCT5条規定の十分な開示が明細書中でなされているということもできない。

(2)

各請求の範囲に規定される組成物のうち、鶏の免疫原として消化酵素の断片を採用した例については、PCT6条の意味において明細書中で十分な裏付けがなされているとはいえないし、PCT5条規定の十分な開示が明細書中でなされているということもできない。